

ヒトCD4+T細胞のp75 IL-2レセプターの発現およびIL-2応答性獲得におけるマクロファージ-T細胞相互作用の必要性に関する研究

著者	中村 嘉彦
号	2340
発行年	1991
URL	http://hdl.handle.net/10097/20638

氏 名 (本籍)	なか 中	むら 村	よし 嘉	ひこ 彦
学 位 の 種 類	博 士 (医 学)			
学 位 記 番 号	医 第 2 3 4 0 号			
学位授与年月日	平 成 3 年 9 月 11 日			
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 2 項該当			
最 終 学 歴	昭 和 56 年 3 月 31 日 名古屋保健衛生大学衛生学部技術科卒業			
学 位 論 文 題 目	Macrophage-T Cell interaction Is Essential for The Induction of p75 Interleukin 2 (IL- 2) Receptor and IL-2 Responsiveness in Human CD 4 ⁺ T cells (ヒト CD 4 ⁺ T 細胞の p75 IL-2 レセプター の発現および IL-2 応答性獲得におけるマク ロファージ T 細胞相互作用の必要性に関す る研究)			
	(主 査)			
論文審査委員	教授 菅 村 和 夫	教授 名 倉	宏	
	教授 橘	武 彦		

論文内容要旨

【目 的】

T細胞の増殖を促す因子として発見されたinterleukin 2は、T細胞表面の特異的受容体interleukin 2 receptor (以下IL-2R)を介して、その生理的作用を示すことが知られている。近年、IL-2Rに対する各種monoclonal抗体(以下mAb)の開発により、NK細胞やCD8⁺ T細胞はp75 IL-2Rを介して、IL-2のsignal伝達を行っていることが報告されている。しかしT細胞subsetであるCD4⁺ T細胞が同一のメカニズムでIL-2に対して応答しているか否かについては、明確にはされていない。本研究はヒト末梢血CD4⁺、CD8⁺ T細胞を用いてp75 IL-2Rの発現およびIL-2に対する応答性の相違について検討を行い、CD4⁺ T細胞の増殖機構の解明、並びにCD4⁺ T細胞による癌の免疫療法の開発を目的とした。

【方 法】

健常者末梢血より単核球分画を分離後、PE標識anti-CD4 mAb (Leu-3a) もしくはPE標識anti-CD8 mAb (Leu-2a) により染色、cellsorter, FACStarにて、それぞれ純度99.7%, 以上にて分離した。次に分離したCD4⁺、CD8⁺ T細胞は非動化10%ヒトAB血清、2000IU/ml recombinant human IL-2 (rIL-2) 加RPMI-1640培地により 2.0×10^6 /mlに浮遊、96穴平底micro-titer plateに100 μ lずつ分注後各々mitomycin C処理10%自己macrophage (以下M ϕ) 添加群および非添加群を作製、37°C, 5%, CO₂下、培養を開始した。培養前後におけるp55, p75 IL-2Rのflow cytometry法による測定は大橋らの原著論文に従った。すなわち、FITC標識anti-p55 IL-2R mAb (H-31), もしくはFITC標識anti-p75 IL-2R mAb (TU-27) にて、PE標識anti-CD8 mAb, もしくはPE標識anti-CD4 mAbとの2重染色を行った後、FACStarを用いてconsort C 30 programのover lay modeにて解析を行った。

【結 果】

分離されたCD8⁺ T細胞は上記培養条件にて強いIL-2応答性を示し、高い増殖反応が認められたが、CD4⁺ T細胞はCD8⁺ T細胞とは対照的に、IL-2に対する応答性をほとんど示さなかった。しかし、CD4⁺ T細胞をM ϕ 存在下、IL-2と共に培養することによりCD8⁺ T細胞よりも強いIL-2応答性が認められた。このCD4⁺、CD8⁺ T細胞のIL-2応答性の違いにおけるIL-2Rの役割について検討したところ、CD8⁺ T細胞においてはp75 IL-2Rが未刺激の状態において確認されたのに対して、CD4⁺ T細胞においてはp75 IL-2Rは認められなかった。しかし、CD4⁺ T細胞をM ϕ 存

在下において混合培養することによりp75 IL-2Rの出現が誘導されると同時に、この時期から著明なCD4⁺ T細胞の増殖が誘導された。また、CD4⁺ T細胞におけるp75 IL-2Rの出現はIL-2非存在下においてもMφとの混合培養のみによって同様に確認された。このCD4⁺ T細胞のIL-2応答性獲得におけるMφの機能はIL-1やMφの培養上清の添加によっては代用されず、anti-CD4 mAb, anti-class II mAb, anti-IL-2 mAbの添加によって強く阻害された。これらの結果より、CD4⁺ T細胞のp75 IL-2Rの出現にはMHC-class II moleculesを介したMφとの細胞間接触が重要であることが考えられた。このようなMφの作用が他のcell line等においても存在しないかどうかを検討する目的で、allogeneic MHC-class II moleculesを強く発現しているRaji細胞との混合培養を行った。その結果Mφと同様に、Raji細胞との混合培養によってもCD4⁺ T細胞におけるp75 IL-2Rの発現および強いIL-2応答性が誘導された。また同時に、Raji細胞に対する強い細胞障害活性が早期に誘導された。しかしMHC-class II molecules陰性の大腸癌由来Colo-205細胞、乳癌由来ZR-75-1細胞によっては、CD4⁺ T細胞からIL-2に対する応答性および細胞障害活性を誘導することはできなかった。また、Raji細胞によって誘導されたCD4⁺ killer T細胞から得られたcloneの解析より、このCD4⁺ T細胞はRaji細胞特異的な細胞障害活性およびIL-2産生能を保持するCD4⁺ helper/killer T細胞であることが判明した。

【結 論】

ヒト末梢血CD4⁺ T細胞はCD8⁺ T細胞とは対照的に、高濃度のIL-2によってもIL-2応答性および増殖反応は示さない。この理由として、CD4⁺ T細胞に有意なp75 IL-2Rが認められないことに起因すると考えられた。しかし、Mφとの混合培養により、CD4⁺ T細胞においてもp75 IL-2Rの出現が認められると同時に、強いIL-2応答性が確認された。これはMφ上のMHC-class II moleculesを介したCD4⁺ T細胞との細胞間接触がp75 IL-2Rの出現に重要であることに基ずくものと考えられた。また、このMφの作用は強いallogeneic MHC-class II moleculesを発現しているRaji細胞によっても同様に認められ、この場合にはRaji細胞特異的な細胞障害活性およびIL-2産生能が早期に誘導された。以上の結果より、helper/killer両活性を有したCD4⁺ T細胞を大量に得ることが可能となり今後の新しい癌治療への発展が期待される。

審 査 結 果 の 要 旨

免疫応答系においてTリンパ球はマクロファージ (M ϕ) 等からの抗原提示により活性化され、IL-2反応性となり、クローナルに増殖すると考えられている。しかし、IL-2受容体 (IL-2R) 特に機能的に重要な β 鎖サブユニットの発現はTリンパ球サブセット (CD4 $^{+}$, CD8 $^{+}$) 間で著しく異なり、これらT細胞のIL-2反応性獲得機構の詳細は明らかでない。本研究は、M ϕ やRaji細胞との混合培養系を用いて、Tリンパ球各サブセットにIL-2反応性ならびにキラー活性を誘導し、これらの機能発現と β 鎖発現との関係を明らかにした。

ヒト末梢血細胞をPE標識anti-CD4 mAbあるいはanti-CD8 mAbで染色し、セルソーター (FACStar) を用いて純度99.7%以上のCD4 $^{+}$ ならびにCD8 $^{+}$ T細胞をそれぞれ分離した。これら細胞をマイクロプレートに分注し、リコンビナントIL-2とマイトマイシン処理M ϕ /Raji細胞を加えて培養し、これらT細胞の増殖と細胞障害活性を調べた。その結果、M ϕ 非存在下ではCD8 $^{+}$ T細胞は強いIL-2反応性増殖を示したが、CD4 $^{+}$ T細胞は殆ど増殖しなかった。逆に、M ϕ 存在下ではCD4 $^{+}$ T細胞はCD8 $^{+}$ T細胞よりも強いIL-2反応性増殖を示した。次にこれらIL-2反応性の違いがIL-2R β 鎖発現の違いによることを明らかにした。CD8 $^{+}$ T細胞は培養前にすでに β 鎖を発現していたが、CD4 $^{+}$ T細胞はM ϕ との混合培養後に初めて β 鎖を発現し、これら細胞の β 鎖発現とIL-2反応性とが良く相関した。さらに、このM ϕ との混合培養によるCD4 $^{+}$ T細胞のIL-2反応性獲得と β 鎖発現は抗MHCクラス II 抗体によって阻止された。CD4 $^{+}$ T細胞はRaji細胞との混合培養によってもIL-2反応性と共にキラー活性をも獲得した。以上の結果から、CD4 $^{+}$ T細胞ではM ϕ /Raji細胞上のMHCクラス II 抗原を介した細胞間接触を通してIL-2R β 鎖の発現が誘導され、それに伴ってIL-2反応性とキラー機能が発現されると推察された。

このように本研究は、CD4 $^{+}$ T細胞とCD8 $^{+}$ T細胞とでIL-2反応性獲得機構が異なることを明らかにし、その違いがIL-2R β 鎖発現の違いに起因していることを初めて証明した。この成果は免疫応答系を理解する上で、重要な知見であり、よって博士号授与に値すると判断する。